昆虫学报 *Acta Entomologica Sinica*, November 2012, 55(11): 1255 - 1263 ISSN 0454-6296

灰飞虱 Bursicon 基因的克隆、序列分析及在不同发育阶段的表达

杨 科，许益鹏，董胜张，俞晓平*

（中国计量学院生命科学学院，浙江省生物计量及检验检疫技术重点实验室，杭州 310018）

摘要：Bursicon 是通过 G 蛋白受体调节昆虫表皮硬化及展翅的功能蛋白，它在昆虫蜕皮后的表皮硬化过程中起着关键作用。为探讨灰飞虱 *Laodelphax striatellus* 的 *bursicon* 的功能，利用 RT-PCR 和 RACE 技术克隆获得 1 126 bp 的 *bursicon* α 和 761 bp 的 *bursicon* β 全长序列，将其分别命名为 *Lsburs-*α 和 *Lsburs-*β。生物信息学分析表明：*Lsburs-*α 开放阅读框长 483 bp，编码 160 个氨基酸，该蛋白具有 2 个 N-豆蔻酰化位点、3 个酪蛋白激酶Ⅱ磷酸化位点以及 2 个蛋白激酶 C 磷酸化位点。*Lsburs-*β 开放阅读框长 417 bp，编码 138 个氨基酸，该蛋白具有 2 个 N-豆蔻酰化位点、3 个酪蛋白激酶Ⅱ磷酸化位点以及 1 个酪氨酸激酶磷酸化位点。qRT-PCR 结果表明：*Lsburs-*α 和 *Lsburs-*β 在灰飞虱各龄期均有转录表达，并在若虫期随龄期增加呈上升趋势，在羽化期达到峰值，成虫期表达量逐渐降低。结果提示 *bursicon* 与灰飞虱蜕皮后的外表皮硬化关系密切。本文结果为深入研究 *bursicon* 的功能、受体调节和信号通路等奠定了基础。

关键词：灰飞虱；*bursicon*；序列分析；同源性分析；基因表达；实时荧光定量 PCR

中图分类号：Q966 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296(2012)11-1255-09

Cloning, sequence analysis and developmental expression of the bursicon gene in the small brown planthopper, *Laodelphax striatellus* (Hemiptera: Delphacidae)

YANG Ke, XU Yi-Peng, DONG Sheng-Zhang, YU Xiao-Ping* (Zhejiang Provincial Key Laboratory of Biometrology and Inspection and Quarantine, College of Life Sciences, China Jiliang University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: Bursicon plays a vital role in insect molting sclerosis, as it regulates cuticle sclerotization (hardening and tanning) via a G protein-coupled receptor (GPCR). To study the function of *bursicon* in the small brown planthopper (SBPH), *Laodelphax striatellus*, the full-length sequences of *bursicon* α and *bursicon* β were amplified by RT-PCR and RACE, and were designated as *Lsburs-*α and *Lsburs-*β, respectively. The products are 1 126 bp and 761 bp in length for *Lsburs-*α and *Lsburs-*β, respectively. *Lsburs-*α contains a 483 bp open reading frame (ORF) encoding a protein with 160 amino acid residues, which has two N-myristoylation sites, three casein kinase Ⅱ phosphorylation sites and two protein kinase C phosphorylation sites. *Lsburs-*β contains a 417 bp ORF encoding a protein with 138 amino acid residues, which has two N-myristoylation sites, three casein kinase Ⅱ phosphorylation sites and one tyrosine kinase phosphorylation site. Real-time quantitative PCR results showed that the transcripts of *Lsburs-*α and *Lsburs-*β were detectable in all the nymphal stages of *L. striatellus*, increased with the nymphal stages, reached the highest level in the emerging period, and then decreased after adult eclosion. The results suggest that *bursicon* closely relates to cuticle sclerotization in *L. striatellus* after molting. The results lay a solid foundation for the further study of *bursicon*'s functions, receptor regulation, signal pathway and so on.

Key words: *Laodelphax striatellus*; *bursicon*; sequence analysis; homology analysis; gene expression; Real-time quantitative PCR

基金项目：国家“973”计划项目(2011CB111602, 2012CB114100, 2010CB126200)；浙江省自然科学基金重点项目(Z3100594)；国家“863”计划项目(2012AA021601)

作者简介：杨科，男，1987 年生，硕士研究生，专业为昆虫分子生物学与生物化学，E-mail：yangyongyao168@sina.com

*通讯作者 Corresponding author, E-mail：yxp@cjlu.edu.cn

收稿日期 Received：2012-10-31；接受日期 Accepted：2012-11-22

灰飞虱 *Laodelphax striatellus*（Fallén）属半翅目飞虱科（Delphacidae），是我国及东南亚水稻产区的主要害虫之一，主要为害早、中稻秧田中分蘖期的水稻植株。除成、若虫刺吸危害外，成虫在水稻植株体内产卵也能造成危害。同时，灰飞虱能取食和为害小麦、玉米等多种禾本科植物，并且能传播多种病毒病，如水稻条纹叶枯病和黑条矮缩病，玉米粗缩病及小麦丛矮病等多种禾本科作物病毒病，给我国农业带来巨大损失（李汝铎等，1996；程遐年等，2003；孙广仲等，2006）。灰飞虱由于食性及对温度的要求和适应性不同，在地理分布上和各稻区的发生为害情况也不同；灰飞虱属短距离迁移性害虫，在华北、华东、华中和西南等地发生为害较重（刘玉娣等，2009）。近年来，灰飞虱为害导致的病毒病呈逐年加重的趋势，由于目前还没有理想的抗病品种以及防治病毒病的药剂，所以通过治虫切断介体是防治病毒病的主要手段，但农药滥用目前已造成灰飞虱对多种杀虫剂产生抗性（Endo *et al.*，2002），因此研究调控灰飞虱生长的相关功能基因及其功能，可以为探索新的灰飞虱防控途径提供线索。

昆虫为了适应生长，必须蜕去旧表皮并重新形成新表皮，这个过程称为蜕皮。每次蜕皮后，由于新的外皮比较柔软、无韧性而不能阻止昆虫水分的流失、外界的伤害以及病原微生物的入侵等（Honegger *et al.*，2008；Song，2012），因此，蜕皮后新的外皮必须有个骨化的过程，而调节其骨化过程的关键因子就是一种神经多肽“Bursicon”。该蛋白于50年前首次在丽蝇 *Calliphora erythocephala* 中发现（Cottrell，1962），当蜕皮期成虫丽蝇的头从颈部被结扎后，由于结扎而阻止了外皮的骨化，当给被结扎头部的丽蝇注入其血淋巴提取物后，其很快表现出骨化现象。在该蛋白发现后的很长一段时间，*Bursicon* 一直被认为是一个分子量大约为 30～60 kDa 的单链蛋白。然而，最近在黑腹果蝇 *Drosophia melanogaster* 中发现其是由两个亚基组成的异源二聚体蛋白即 Bursicon α 和 Bursicon β 组成，相应分子量分别为 16 kDa 和 14 kDa（Luo *et al.*，2005；Mendive *et al.*，2005），这也是第一个在昆虫中发现的异源胱氨酸激素。通过黑腹果蝇 *D. melanogaster* 的遗传分析表明，Bursicon 主要是通过一个由 rickets 编码的特殊的 G 蛋白受体 DLGR2 来调控外皮的骨化和翅扩张（Baker and Truman，2002）；进一步研究发现，DLGR2 一旦被激活，它将激活信号通路 cAMP/PKA（Kimura *et al.*，2004），而且 *bursicon* 主要是由脑调控并在中枢神经系统转录表达（Honegger *et al.*，2008）。

有关灰飞虱 *bursicon* 的工作目前还未见报道。本研究首次从灰飞虱体内克隆到 *bursicon* 的 α 和 β 基因片段，并通过 RACE 技术获得其 cDNA 全长，利用实时荧光定量 PCR 检测了两个基因在不同龄期和蜕皮前后的时相表达特性。研究结果将为从分子水平理解灰飞虱 Bursicon 的生理生化功能奠定基础，也为该基因作为潜在防治靶标的可能性提供佐证。

1 材料和方法

1.1 供试虫源

试验所用的灰飞虱采集于浙江杭州稻田，在人工气候室中利用盆栽大麦苗饲养 10 代以上的实验种群，培养温度 28±2℃，相对湿度 80%，光周期 16L∶8D。

根据灰飞虱各龄期生长周期的长短分别采集 2－5 龄若虫和成虫（李伟等，2009），在每个龄期的蜕皮时期取虫并结合显微镜下观察确认。取虫后迅速放入液氮保存。

1.2 灰飞虱总 RNA 提取和反转录

分别取各龄期的灰飞虱雌、雄各 10 头整虫为一个生物学重复，每个龄期设 3 个重复。按 TRIzol（Invitrogen）试剂使用说明提取总 RNA，琼脂糖凝胶电泳和蛋白核酸定量分析仪（Thermo）进行检测和定量。以总 RNA 为模板，用反转录试剂盒（TaKaRa 公司）反转录获得第一链 cDNA，作为 cDNA 模板，4℃贮存备用，－20℃长期贮存。

1.3 灰飞虱 *bursicon* 的扩增与 RACE 反应

PCR 反应中所用引物为自己设计（表 1），并由铂尚生物技术有限公司合成。反应体系为 50 μL，其中包括 0.25 μL rTaq DNA 聚合酶（5 U/μL），引物（10 μmol/L）各 1 μL，4 μL dNTPs（2.5 mmol/L），5 μL 10×buffer（含 Mg^{2+}），2 μL cDNA 模板，加灭菌双蒸水至 50 μL。PCR 反应程序为：94℃预变性 3 min；94℃变性 30 s，退火温度见表 1，72℃延伸 1 min，35 个循环；72℃延伸 10 min。扩增完成后，取 5 μL 反应产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。

根据扩增得到的中间片段，分别设计外围引物 LsRACEaF1，LsRACEaR1，LsRACEbF1 和 LsRACEbR1，内侧引物 LsRACEaF2，LsRACEaR2，LsRACEbF2 和

LsRACEbR2（表 1）。RACE 反应参照试剂盒说明书（Clontech）进行。通过 RACE 扩增，分别获得 *Lsburs-α* 和 *Lsburs-β* 的 5′ 和 3′ cDNA 末端片段，扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测，回收目的片段。

表 1　本研究所用的引物

Table 1　Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列(5′－3′) Primer sequence	退火温度(℃) Annealing temperature
LsbursF1	ATGATGCTGGCTGAGAGCTTCC	
LsbursR1	CTATCGAGAGCTGTGTAATCTGAAG	55
LspbursF2	AGATCCACATCATCAAGGAGGARYWNGAYGA	
LspbursR2	CCGGATGCCGTCCGSRTCRTARCA	54
qLsbursF3	CTGCCCAAAAGCCAAACCA	
qLsbursR3	ATCGGACCCTCGTCAGCAT	60
qLspbursF4	CCAGTGTTGTCACCCCTACCG	
qLspbursR4	GTGATTGTTCTCTCGCGCAAA	60
β-actinF	TGGACTTCGAGCAGGAAATGG	
β-actinR	ACGTCGCACTTCATGATCGAG	60
LsRACEaF1	GTGCTCCAATACCCTGGCTGTGTTC	
LsRACEaF2	TGCCCAAAAGCCAAACCAGGAGAGA	60
LsRACEaR1	CAGGGACGACACATACAATCCAGAG	
LsRACEaR2	TCTCTCCTGGTTTGGCTTTTGGGCA	60
LsRACEbF1	AGCCGTGAACAAGTGTGAAGGAGCG	
LsRACEbF2	ATCACACTGACCCACTGCTACGACC	60
LsRACEbR1	CACGGCAGCAGAAACATTCCTTGAG	
LsRACEbR2	CGCTCCTTCACACTTGTTCACGGCT	60

1.4　PCR 产物序列的测定

回收的 DNA 片段经纯化后，连接到 pMD18-T 载体上（TaKaRa 公司），连接产物转化大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5α 感受态细胞，挑取白色菌落至 5 mL 的 LB 培养液（Ampicillin 终浓度 50 μg/ mL）中，37℃震荡过夜。取 10 μL 菌液，用煮沸法提取质粒，通过 PCR 鉴定阳性克隆，并送铂尚生物技术有限公司测序，每个 PCR 产物至少挑取 3 个单菌落用于序列测定。测序结果在 GenBank 中进行 Blast 同源序列检索予以确认，再经 DNAMAN 和 DNAstar 拼接得到基因全长。

1.5　序列分析

利用 Blast 在 NCBI 网站进行序列相似性比对分析；DNAstar 进行 ORF 预测以及蛋白翻译。蛋白翻译和基序分析及其理化性质预测采用蛋白组学在线 ExPASy（http://web. expasy. org/protparam/），跨膜预测采用在线工具 TMpred（http://www. ch. embnet. org/software/TMPRED_form. html），蛋白的功能二级结构预测采用 PredictProtein（http://www. predictprotein. org/），蛋白的功能域预测利用 NCBI 网站的在线工具 Conserved Domains（http://www. ncbi. nlm. nih. gov/Structure/cdd/wrpsb. cgi），信号肽段的预测采用 SignalP4. 0（http://www. cbs. dtu. dk/services/SignalP/），然后利用 DNAMAN 进行多序列比对分析。

从 NCBI 数据库中选取具有代表性的物种（包括昆虫、甲壳纲）*bursicon* 的 cDNA 序列，用 DNAstar 将其 ORF 翻译成对应的氨基酸序列，然后利用 ClustalX 1. 83 软件进行完全比对后，再用 MEGA 5. 05软件中的 Neighbor-Joining（自举检验数 1 000）方法进行分子系统进化分析。

1.6　灰飞虱不同龄期以及蜕皮前后 *bursicon* 的表达分析

根据 *Lsburs-α* 和 *Lsburs-β* 扩增得到的序列设计

特异性引物 *qLsbursF*3-qLsbursR3 和 qLspbursF4-qLspbursR4(表 1)用于后续的实时荧光定量 PCR 反应，以 β-actin 基因作为内参基因(Wu *et al*., 2012)。以标准曲线和溶解曲线来检测所设计引物的扩增效率和特异性。

荧光定量 PCR 采用 25 μL 体系，各反应成分的以灰飞虱 cDNA 为模板，进行 5 倍稀释。扩增体系为：12.5 μL SYBR Premix *Ex Taq*(TaKaRa Code：DRR420A)，引物(10 μmol /L)各 0.5 μL，2 μL cDNA 模板，加灭菌双蒸水至 25 μL。PCR 反应条件为：95℃预变性 3 min；95℃变性 10 s，60℃退火 45 s 循环 40 次。使用仪器为 Bio-Rad 公司的 iQ5 荧光定量 PCR 仪。反应结束后收集 Ct 值，采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行数据分析(Livak and Schmittgen, 2001)。每龄期重复 3 次。

1.7 数据统计与分析

灰飞虱 *Lsburs-α* 和 *Lsburs-β* 各自在不同发育阶段转录水平的差异比较采用 PASW Statistics 18 进行单因素方差分析(ANOVA)，显著性差异采用 Duncan 氏法进行检验($P<0.05$)。

2 结果与分析

2.1 灰飞虱 *bursicon* 全长 cDNA 的扩增与序列分析

以灰飞虱的 cDNA 为模板，以引物 LsbursF1-LsbursR1、LspbursF2- LspbursR2(表 1)进行常规 PCR 扩增：*Lsburs-α* 用引物 LsbursF1-LsbursR1 扩增后最终得到一条 435 bp 的特异条带(图 1：A)；*Lsburs-β* 用引物 LspbursF2-LspbursR2 扩增后得到一条 420 bp 的特异条带(图 1：A)。扩增产物经回收、克隆及测序后在 NCBI 核酸库中进行 Blast 分析，结果发现这两条序列与其他物种 *bursicon* 的相似性最高，推测所获得的两条片段是灰飞虱 *bursicon* 的部分 cDNA 序列。将 435 bp 的基因命名为 *Lsburs-α*，420 bp 的基因命名为 *Lsburs-β*。根据所得的 cDNA 部分片段设计特异引物(表 1)分别进行基因 5′RACE 和 3′RACE 扩增(图 1：B)，序列经过 DNAMAN 和 DNAstar 拼接得到 *Lsburs-α* cDNA 序列全长 1 126 bp 和 *Lsburs-β* cDNA 序列全长 761 bp。

经 DNAstar 分析表明，*Lsburs-α* cDNA 全长序列含有一个完整 483 bp 的 ORF，编码 160 个氨基酸，5′-UTR 共 142 bp，3′-UTR 共 501 bp，具有真核生物典型 AATAAA 加尾信号和 polyA 结构(图 2)；经 Blastn 分析发现，该 ORF 序列与西方蜜蜂 *Apis mellifera* 的一致性最高，达 75%，与其他昆虫 *bursicon α* 序列一致性最低都在 65% 以上。*Lsburs-β* 的 cDNA 全长序列含有一个完整 417 bp 的 ORF，编码 138 个氨基酸，5′-UTR 共 66 bp，3′-UTR 共 278 bp，同样具有典型的 AATAAA 加尾信号和 polyA 结构(图 3)；经 Blastn 分析发现，该 ORF 序列与豌豆蚜 *Acyrthosiphon pisum* 的一致性最高，达 79%，与其他昆虫 *bursicon β* 序列一致性都不低于 60%。

2.2 灰飞虱 Bursicon 理化性质分析

通过 ExPASy 分析，*Lsburs-α* 的开放阅读框编码 160 个氨基酸的蛋白质，其相对分子量为 17 484.2，理论等电点为 7.48；分子式为 $C_{758}H_{1200}N_{208}O_{229}S_{19}$，共有 2 413 个原子组成；稳定系数为 48.83，推测该蛋白较为不稳定。利用 TMPRED 预测该蛋白可能有 1 个跨膜区域。PredictProtein 分析发现该蛋白有 2 个 N-豆蔻酰化位点、3 个酪蛋白激酶Ⅱ磷酸化位点以及 2 个蛋白激酶 C 磷酸化位点(图 2)，其中螺旋结构占 8.12%，片层结构占 26.88%，其他结构占 65%。经保守结构域预测表明该蛋白具有一个由胱氨酸结蛋白组成的糖蛋白激素结构域，并且该蛋白在其保守位置具有 11 个半胱氨酸，为其典型特征。SignalP4.0 显示该蛋白含有长度为 24 个氨基酸的信号肽：MTCTIQIFIHGAFVLAMMLAESFQ。

Lsburs-β 的开放阅读框编码 138 个氨基酸的蛋白质，其相对分子量为 15 822.9，理论等电点为 4.98；分子式为 $C_{682}H_{1067}N_{187}O_{218}S_{14}$，共有 2 168 个原子组成；稳定系数为 64.15，推测该蛋白也以不稳定的方式存在。该蛋白经预测可能有 1 个跨膜区域，而且该蛋白有 2 个 N-糖基化位点、3 个蛋白激酶Ⅱ磷酸化位点以及 1 个酪氨酸激酶磷酸化位点(图 3)，其中片层结构占45.65%，其他结构占 54.34%，不含螺旋结构。该蛋白经预测可能没有糖蛋白激素结构域，但该蛋白在其保守位置具有 11 个半胱氨酸，为其典型特征。SignalP4.0 预测表明，该蛋白也含有长度为 23 个氨基酸的信号肽：METHTLILLLFTSSEVWFYKAYA。

2.3 灰飞虱 *bursicon* 的进化关系分析

分子系统进化分析表明，Busicon α 亚基与豌豆

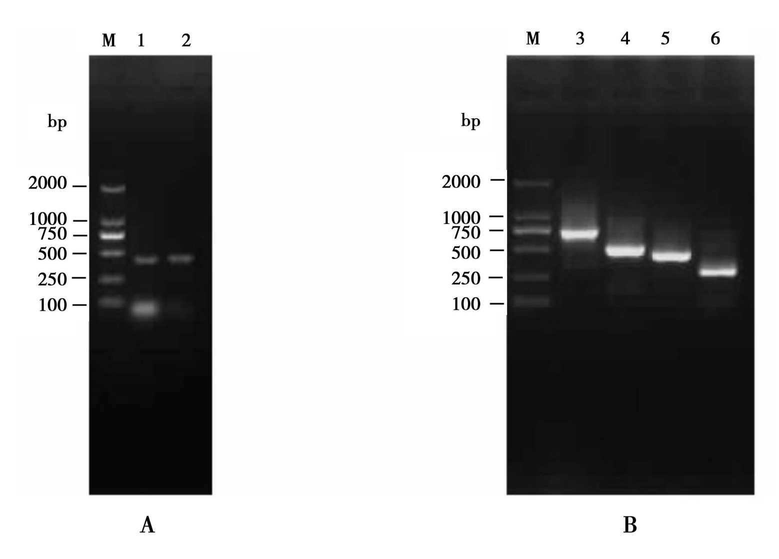


图 1　灰飞虱 *bursicon* cDNA 序列(A)和 *bursicon* 的 RACE 产物(B)检测

Fig. 1　PCR amplification of cDNA fragments (A) and RACE products (B) of *bursicon* from *Laodelphax striatellus*

M：DNA 分子量标准 DL2000 marker；1：*Lsburs-α* 的扩增产物 Amplified products of *Lsburs-α*；2：*Lsburs-β* 的扩增产物 Amplified products of *Lsburs-β*；3：*Lsburs-α* 3′ RACE 产物 3′ RACE products of *Lsburs-α*；4：*Lsburs-α* 5′ RACE 产物 5′ RACE products of *Lsburs-α*；5：*Lsburs-β* 3′ RACE 产物 3′ RACE products of *Lsburs-β*；6：*Lsburs-β* 5′ RACE 产物 5′ RACE products of *Lsburs-β*.

```
1     ACATGGGGAGTATTTAAAGGTTCATTGAACCACTCATAGCCCTTCTCTCCCTTATATCAGATAGGAGTATAAAAG
76    TTTCTCTATGTATGTTACTTGAATAAAAGTATCTCAAAAGTACCTAGGTTAAGATTTCAATTTCGAAATGACCTG
1                                                                              M  T  C
151   CACGATTCAAATTTTCATACATGGAGCATTTGTTCTTGCCATGATGTTGGCTGAGAGCTTCCAAGAAGAGACCAA
4      T  I  Q  I  F  I  H  G  A  F  V  L  A  M  M  L  A  E  S  F  Q  E  E  T  K
226   ACCTCCGGCCGGTGCTGTCTCCTCAGATGAGTGTCAGGTCACACCCGTCATTCATGTGCTCCAATACCCTGGCTG
29     P  P  A  G  A  V  S  S  D  E  C  Q  V  T  P  V  I  H  V  L  Q  Y  P  G  C
301   TGTTCCAAAACCAATCCCTTCATTCGCATGCACTGGGAAATGTAGCAGTTACTTACAGGTTTCAGGATCGAAAAT
54     V  P  K  P  I  P  S  F  A  C  T  G  K  C  S  S  Y  L  Q  V  S  G  S  K  I
376   ATGGCAAATGGAAAGATCATGCATGTGCTGCCAAGGGAGTGGAGAAAGGGAGGCCAGTGTATCTCTATTCTGCCC
79     W  Q  M  E  R  S  C  M  C  C  Q  G  S  G  E  R  E  A  S  V  S  L  F  C  P
451   AAAAGCCAAACCAGGAGAGAAGAAATTCCGCAAGGTGAACACAAAAGCGCCCCTGGATTGTATGTGTCGTCCCTG
104    K  A  K  P  G  E  K  K  F  R  K  V  N  T  K  A  P  L  D  C  M  C  R  P  C
526   CACCGGGGTAGAGGAGACTTCGGTAATACCTCAAGAAATAGCTGGATATGCTGACGAGGGTCCGATGAATAACCA
129    T  G  V  E  E  T  S  V  I  P  Q  E  I  A  G  Y  A  D  E  G  P  M  N  N  H
601   TTTCAGATTACACAGCTCTCGATAGAAGTAATAAAAGAATACTATGAATATTATTTCATCAAATTCTATTATTGT
154    F  R  L  H  S  S  R  *
676   ACAATAGTTGATCGCCAATTACTTTTACCAACACTAATATATCAGCTACTAAGTTCAAATCCGAGGAACAGTTTT
751   ATTAAATTCATAACTAGCTTCAGATGGTTTTGATATTATTATTGCAGTGACTTAGAATAATAAGACATGATAATT
826   AAACGTGCATACACATGATAATTGTAGTCCTACTACTGCATTCATTCATGAGCCATCATAGAAGATGGATCTTGT
901   AATAGTGTTTTCTGTTTGGCATCTATCATGCAACAAATAAAAGTTTCTGTTTTTCAAAATTAGATTACTATTTCG
976   AGAACCGATTCCTTACGGCTCAAAACCTCAAATGCTTCCATGCAGTCTCGATTATATCATTATTCTCATTTTGGA
1051  AGGAGTCTTTTGTATAAGCATGAACTGAATAAATTCCTGCTGACCACAAAAAAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
1126  A
```

图 2　灰飞虱 *bursicon α* cDNA 核酸序列及推导的氨基酸序列

Fig. 2　Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of *bursicon α* from *Laodelphax striatellus*

2 个 N-豆蔻酰化位点的氨基酸残基用方框标识 Two potential N-myristoylation sites are boxed；3 个酪蛋白激酶Ⅱ磷酸化位点的氨基酸残基用下划线标识 Three casein kinase Ⅱ phosphorylation sites are underlined；2 个蛋白激酶 C 磷酸化位点的氨基酸残基用波浪线标识 Two protein kinase C phosphorylation sites are marked with wavy lines.

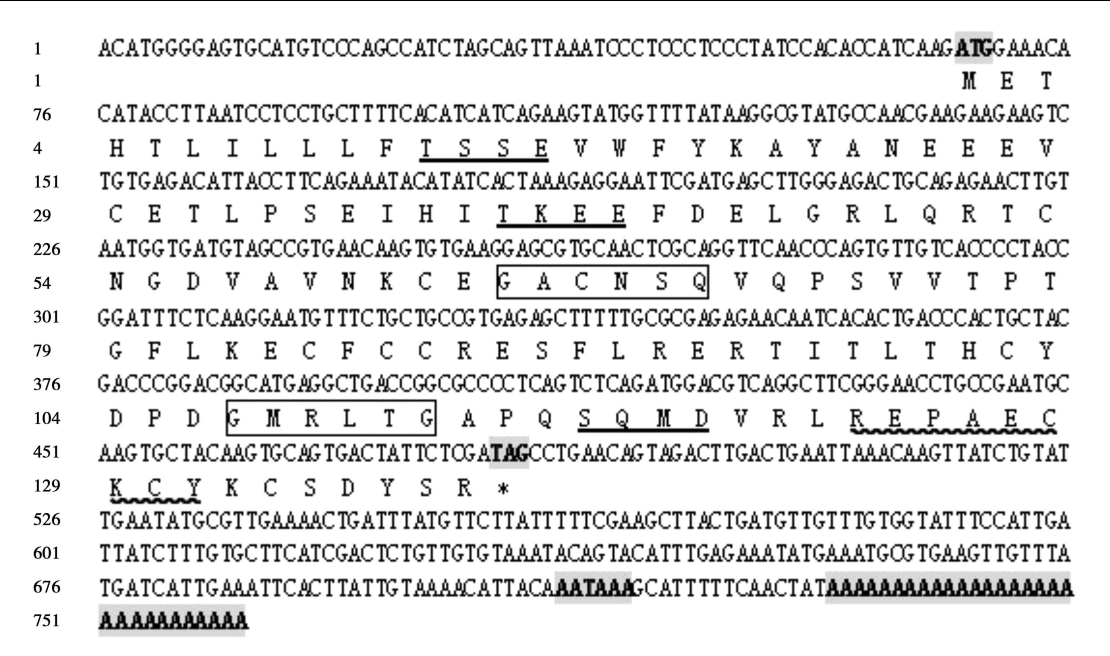


图3　灰飞虱 *bursicon* β cDNA 核酸序列及推导的氨基酸序列

Fig. 3　Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of *bursicon* β from *Laodelphax striatellus*

2 个 N-豆蔻酰化位点的氨基酸残基用方框标识 Two potential N-myristoylation sites are boxed; 3 个酪蛋白激酶Ⅱ磷酸化位点的氨基酸残基用下划线标识 Three casein kinase Ⅱ phosphorylation sites are underlined; 1 个酪氨酸激酶磷酸化位点的氨基酸残基用波浪线标识 One tyrosine kinase phosphorylation site is marked with wavy line.

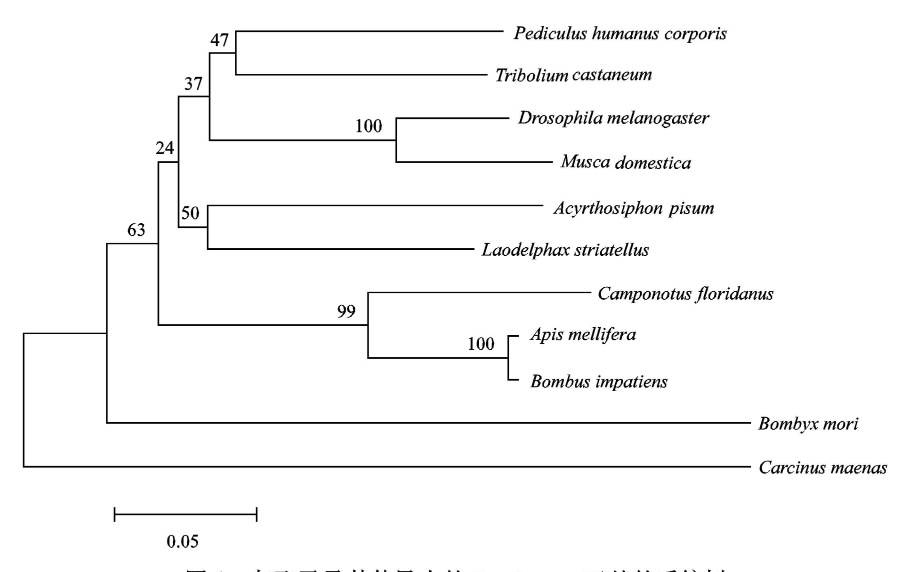


图4　灰飞虱及其他昆虫的 Bursicon α 亚基的系统树

Fig. 4　Phylogenetic trees of the Bursicon α subunit from *Laodelphax striatellus* and other insects

昆虫名称及其 Bursicon α 亚基的 GenBank 登录号 Insect species and GenBank accession numbers of their Bursicon α subunits: 豌豆蚜 *Acyrthosiphon pisum* (XP_001946341.1); 西方蜜蜂 *Apis mellifera* (NP_001091704.1); 熊蜂 *Bombus impatiens* (XP_003485714.1); 家蚕 *Bombyx mori* (NP_001091845.1); 佛罗里达弓背蚁 *Camponotus floridanus* (EFN71945.1); 普通滨蟹 *Carcinus maenas* (ABX55995.1); 黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* (NP_650983.1); 灰飞虱 *Laodelphax striatellus*; 家蝇 *Musca domestica* (ABO20870.1); 人体虱 *Pediculus humanus corporis* (XP_002430782.1); 赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* (NP_001107779.1).

蚜 *A. pisum* 的相应亚基聚为一类，Bursicon β 亚基与赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 的相应亚基聚为一类。

2.4　*bursicon* 在灰飞虱不同发育阶段中的相对转录水平

利用 Real-time quantitative PCR 对 *bursicon* 的 α

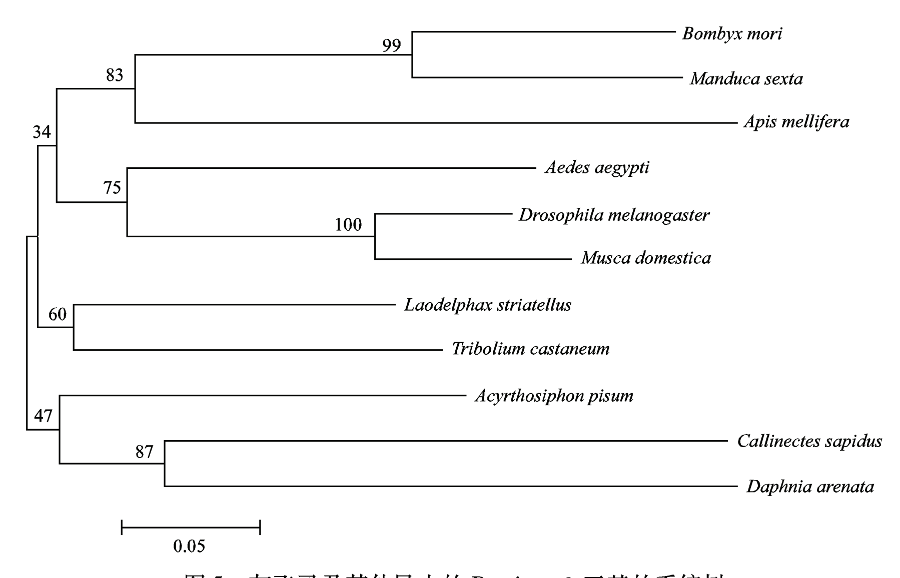


图 5　灰飞虱及其他昆虫的 Bursicon β 亚基的系统树

Fig. 5　Phylogenetic trees of the Bursicon β subunit from *Laodelphax striatellus* and other insects

昆虫名称及其 Bursicon β 亚基的 GenBank 登录号 Insect species and GenBank accession numbers of their Bursicon β subunits：豌豆蚜 *Acyrthosiphon pisum*（XP_001946298.1）；埃及伊蚊 *Aedes aegypti*（XP_001663910.1）；西方蜜蜂 *Apis mellifera*（NP_001035352.2）；家蚕 *Bombyx mori*（NP_001037289.1）；蓝蟹 *Callinectes sapidus*（ACG50066.1）；水蚤 *Daphnia arenata*（ABX55997.1）；黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*（NP_609712.1）；灰飞虱 *Laodelphax striatellus*；烟草天蛾 *Manduca sexta*（ABB92831.1）；家蝇 *Musca domestica*（ABO20869.1）；赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*（NP_001107780.1）.

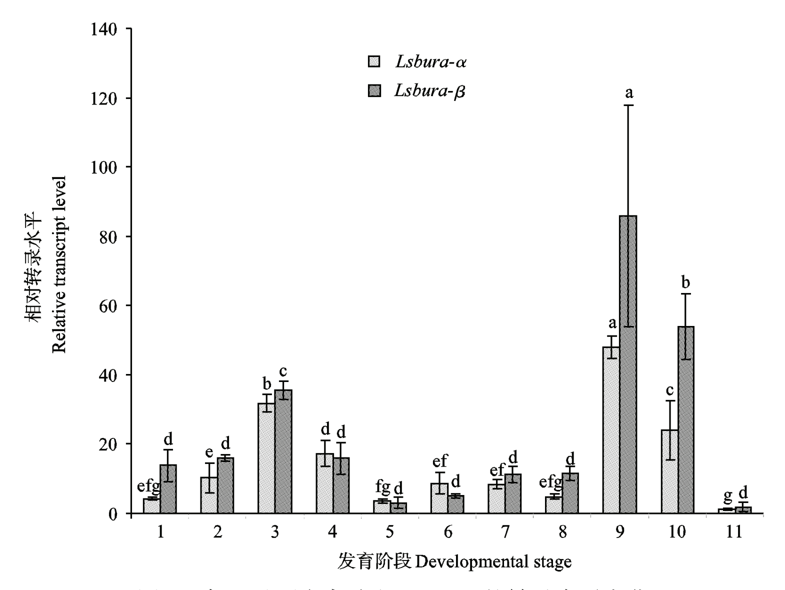


图 6　灰飞虱不发育阶段 *bursicon* 的转录水平变化

Fig. 6　Relative transcript levels of *bursicon* in different developmental stages of *Laodelphax striatellus*

1：2 龄若虫 2nd instar nymph；2：3 龄若虫 3rd instar nymph；3：4 龄若虫 4th instar nymph；4：5 龄若虫第 1 天 1st day of the 5th instar nymph；5：5 龄若虫第 2 天 2nd day of the 5th instar nymph；6：5 龄若虫第 3 天 3rd day of the 5th instar nymph；7：5 龄若虫第 4 天 4th day of the 5th instar nymph；8：5 龄若虫第 5 天 5th day of the 5th instar nymph；9：5 龄若虫第 6 天 6th day of the 5th instar nymph；10：成虫第 1 天 1st day of adult；11：成虫第 2 天 2nd day of adult. 利用 PASW Statistics 18 进行单因素 ANOVA 分析，同种颜色柱上不同小写字母表示基因的相对转录水平差异显著（$P<0.05$，Duncan 氏检验法）。Different lower-case letters above columns with the same colour indicate statistically significant differences（$P<0.05$，Duncan's test），analyzed by PASW Statistics 18 through one-way ANOVA analysis of variance.

和 *β* 在灰飞虱不同龄期的相对转录水平进行检测。结果表明，*Lsburs-α* 和 *Lsburs-β* 在 2－5 龄若虫和成虫中均有转录表达；不同龄期结果显示，在 2－5 龄若虫中两个基因转录水平呈上升趋势，在羽化的时

候转录水平达到最大。羽化前后的结果显示，在羽化前几天 *bursicon* 转录水平较低，但在羽化时其转录水平急剧上升，而羽化后其转录水平呈下降趋势；到成虫时，其转录水平也大幅度下降(图 6)。通过比较发现：*Lsburs-α* 下降趋势明显比 *Lsburs-β* 快。

3 讨论

Bursicon 属于胱氨酸蛋白结蛋白家族，其与各种生长因子相关，比如骨形态发生蛋白(BMPs)、转化生长因子 β(TGF-β)、糖蛋白激素以及黏液素(Vitt *et al.*, 2001; Luo *et al.*, 2005)。本研究中，首次克隆了灰飞虱 bursicon 两个亚基的 cDNA 全长，分别命名为 *Lsburs-α* 和 *Lsburs-β*。*Lsburs-α* cDNA 全长 1 126 bp，开放阅读框长 483 bp，编码 160 个氨基酸，经分析发现，Lsburs-α 具有一个糖蛋白激素结构域，这与其在生物生长发育中调节骨化的功能密切相关；蛋白同源比对表明：Lsburs-α 具有高度保守的区域，并且表现出该蛋白的特征结构即由 11 个半胱氨酸组成的功能区域，特别是第 6 位的半胱氨酸在两个单体中起着连接二硫键的作用(Luo *et al.*, 2005)。*Lsburs-β* 开放阅读框长 417 bp，编码 138 个氨基酸的蛋白质，该蛋白可能没有相关结构域，其原因可能与 Bursicon 两个亚基执行不同功能相关。Lsburs-β 具有 Bursicon 的典型特点即在功能区域具有 11 个保守的半胱氨酸组，其中第 6 位的半胱氨酸参与形成二硫键以连接两个单体(Luo *et al.*, 2005)。系统进化树分析表明，Bursicon α 亚基与豌豆蚜 *A. pisum* 聚为一类，这可能因为二者亲缘关系较近有关；Bursicon β 亚基蛋白与赤拟谷盗 *T. castaneum* 的相应亚基聚为一类，这与褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 转录组的研究结果一致。褐飞虱转录组的研究结果显示：在褐飞虱 *N. lugens* 中 *bursicon* 的转录本与赤拟谷盗 *T. castaneum* 和人体虱 *Pediculus humanus corporis* 的相似(Xue *et al.*, 2010)。进化树的结果暗示这两个亚基在进化上可能为非协同进化。

进一步研究表明：该基因在灰飞虱发育的各个阶段均有表达。实时荧光定量 PCR 检测表明 *bursicon* 的 *α* 和 *β* 在灰飞虱体内都有转录表达，在不同龄期呈上升趋势，在 5 龄第 6 天即羽化的时候达到峰值，而在羽化前期转录量较低，在羽化时急剧上升，而在羽化后 24 h 内呈下降趋势，48 h 后呈急剧下降。从此实验结果中我们可以得出许多重要的结论：首先，*Lsburs-α* 和 *Lsburs-β* 两个基因在不同龄期和羽化期即蜕皮前后转录水平相当、模式相似，这与其他昆虫类似，即它们是在中枢神经系统中联合转录表达(Luo *et al.*, 2005; Luan *et al.*, 2006; Dai *et al.*, 2008)，最终 *Lsburs-α* 和 *Lsburs-β* 共同形成二聚体黏液素。其次，在不同龄期其表达量呈上升趋势，这与其生理需求量是协调一致，而在蜕皮前其表达量相对较低，这和黏液素功能密切相关(Honegger *et al.*, 2008)。在羽化后数小时或者第 1 天内，*Lsburs-α* 下降趋势明显比 *Lsburs-β* 快(Honegger *et al.*, 2011)，其原因是可能因为在不完全变态昆虫中，在羽化后一段时间内表达 *bursicon* 的神经细胞并没有立即凋亡，它们继续产生神经多肽(Honegger *et al.*, 2008)，或者是 *Lsburs-α* 和 *Lsburs-β* 拥有各自完全不相同的剪接方式造成了 *Lsburs-α* 下降趋势比 *Lsburs-β* 明显，也可能是 *Lsburs-α* 和 *Lsburs-β* 的转录调控是相互独立的原因(Luo *et al.*, 2005; Luan *et al.*, 2006; Robertson *et al.*, 2007; Wilcockson and Webster, 2008)。

综上所述，我们通过 RACE 技术获得了 *Lsburs-α* 和 *Lsburs-β* 全长 cDNA 序列，并分析其预测蛋白的相关特性，通过实时荧光定量 PCR 技术研究了 *bursicon* 的表达时相。研究结果为进一步确定 *bursicon* 在灰飞虱蜕皮后外皮的骨化过程中的功能奠定了基础。

参考文献(References)

Baker JD, Truman JW, 2002. Mutations in the *Drosophila* glycoprotein hormone receptor, rickets, eliminate neuropeptide-induced tanning and selectively block a stereotyped behavioral program. *J. Exp. Biol.*, 205: 2555-2565.

Cheng XN, Wu JC, Ma F, 2003. Brown Planthopper: Occurrence and Control. China Agriculture Press, Beijing. [程遐年，吴进才，马飞，2003. 褐飞虱研究与防治. 北京：中国农业出版社]

Cottrell CB, 1962. The imaginal ecdysis of blowflies. The control of cuticular hardening and darkening. *J. Exp. Biol.*, 39: 395-411.

Dai L, Dewey EM, Zitnan D, Luo CW, Honegger HW, Adams ME, 2008. Identification, developmental expression, and functions of bursicon in the tobacco hawkmoth, *Manduca sexta*. *J. Comp. Neurol.*, 506: 759-774.

Endo S, Takahadhi A, Tsutumachi M, 2002. Insecticides susceptibility of the small brown planthopper *Laodelphax striatellus* Fallén (Homoptera: Delphacidae), collected from East Asia. *Jpn. J. Appl. Entomol. Z.*, 37(1): 79-84.

Honegger HW, Deway EM, Ewer J, 2008. Bursicon, the tanning hormone of insects: recent advances following the discovery of its

molecular identity. *J. Comp. Physiol. A*, 194: 989 – 1005.

Honegger HW, Estévez-Lao TY, Hillyer JF, 2011. Bursicon-expressing neurons undergo apoptosis after adult ecdysis in the mosquito *Anopheles gambiae*. *J. Insect Physiol*., 57: 1017 – 1022.

Kimura K, Kodama A, Hayasaka Y, Ohta T, 2004. Activation of the cAMP/PKA signaling pathway is required for post ecdysial cell death in wing epidermal cells of *Drosophila melanogaster*. *Development*, 131: 1597 – 1606.

Li RD, Ding JH, Hu GW, 1996. Brown Planthopper and Its Population Management. Fudan University Press, Shanghai. [李汝铎，丁锦华，胡国文，1996. 褐飞虱及其种群管理. 上海：复旦大学出版社]

Li W, Guo HF, Wang RF, Liu BS, Zhong WF, Fang JC, 2009. Comparison of the life tables of *Laodelphax striatellus* (Homoptera: Delphacidae) on different host plants. *Acta Entomologica Sinica*, 52 (5):531 – 536. [李伟，郭慧芳，王荣富，刘宝生，钟万芳，方继朝，2009. 不同寄主植物上灰飞虱种群生命表的比较. 昆虫学报，52(5)：531 – 536]

Liu YD, Lin KJ, Han LZ, Hou ML, 2009. Molecular identification of *Nilaparvata lugens* (Stål), *Sogatella furcifera* (Horvath) and *Laodelphax striatellus* (Fallén) (Homoptera: Delphacidae) based on rDNA ITS1 and ITS2 sequence. *Acta Entomologica Sinica*, 52 (11): 1266 – 1272. [刘玉娣，林克剑，韩兰芝，侯茂林，2009. 基于 rDNA ITS1 和 ITS2 序列的褐飞虱、白背飞虱和灰飞虱的分子鉴定. 昆虫学报，52(11)：1266 – 1272]

Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods*, 25: 402 – 408.

Luan H, Lemon WC, Peabody NC, Pohl JB, Zelensky PK, Wang D, Nitabach MN, Holmes TC, White BH, 2006. Functional dissection of a neuronal network required for cuticle tanning and wing expansion in *Drosophila*. *J. Neurosci*., 26(2): 573 – 584.

Luo CW, Dewey EM, Sudo S, Ewer J, Hsu SY, Honegger HW, Hsueh AJ, 2005. Bursicon, the insect cuticle-hardening hormone, is a heterodimeric cystine knot protein that activates G protein-coupled receptor LGR2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102: 2820 – 2825.

Mendive FM, Loy TV, Claeysen S, Poels J, Williamson M, Hauser F, Grimmelikhuijzen CJP, Vassart G, Broeck JV, 2005. *Drosophila* molting neurohormone bursicon is a heterodimer and the natural agonist of the orphan receptor DLGR2. *Febs Lett*., 579: 2171 – 2176.

Robertson HM, Navik JA, Walden KKO, Honegger HW, 2007. The bursicon gene in mosquitoes: an unusual example of mRNA trans-splicing. *Genetics*, 176: 1351 – 1353.

Song QS, 2012. Bursicon, a neuropeptide hormone that controls cuticle tanning and wing expansion. In: Gilbert LI ed. Insect Endocrinology. Academic Press, CA. 93 – 105.

Sun GZ, Chen ZQ, Yu ZL, Zhang DY, 2006. The character of virus diseases outbreak and the strategy to adjust the cultivated and agrium transmitted by the small brown planthopper. *Shanghai Agricultural Science and Technology*, (2): 108 – 109. [孙广仲，陈志清，郁祖良，张大友，2006. 灰飞虱传播的病毒病发生流行特点及耕作与栽培措施调整对策. 上海农业科技，(2)：108 – 109]

Vitt UA, Hsu SY, Hsueh AJ, 2001. Evolution and classification of cystine knot-containing hormones and related extracellular signaling molecules. *Mol. Endocrinol*., 15(5): 681 – 694.

Wilcockson DC, Webster SG, 2008. Identification and developmental expression of mRNAs encoding putative insect cuticle hardening hormone, bursicon in the green shore crab *Carcinus maenas*. *Gen. Comp. Endocr*., 156: 113 – 125.

Wu WJ, Wang Y, Huang HJ, Bao YY, Zhang CX, 2012. Ecdysone receptor controls wing morphogenesis and melanization during rice planthopper metamorphosis. *J. Insect Physiol*., 58: 420 – 426.

Xue J, Bao YY, Li BL, Cheng YB, Peng ZY, Liu H, Xu HJ, Zhu ZR, Lou YG, Cheng JA, Zhang CX, 2010. Transcriptome analysis of the brown planthopper *Nilaparvata lugens*. *PLoS ONE*, 5 (12): e14233.

（责任编辑：赵利辉）